環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》イソプロチオラン測定キット

平成１６年１２月

山　口　県

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領（平成１６年８月３１日　環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の２者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）
山口県環境保健研究センター
所　　長　　宮村　惠宣

（環境技術開発者）
株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
代表取締役社長　　河野　　猛

目　次

１．実証試験の概要と目的 …… １
1.1 実証試験の概要と目的 …… １
1.2 実証試験の視点 …… １
２．実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌 …… ２
2.1 実証試験の参加組織 …… ２
2.2 実施体制 …… ２
2.3 実証試験参加者の責任分掌 …… ３
３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要 …… ４
3.1 実証対象技術の原理 …… ４
3.2 実証対象製品のデータ …… ４
４．実証試験のデザイン …… ６
4.1 実証試験の期間 …… ６
4.2 実証試験の内容 …… ７
4.3 実証対象製品の受け入れと管理 …… ８
4.4 実証試験の方法 …… １０
（1）基本的な性能試験 …… １１
①測定範囲試験 …… １１
②検出下限及び定量下限試験 …… １１
③繰返し再現性試験 …… １１
④日間再現性試験 …… １２
⑤期間再現性試験 …… １２
⑥プレート間再現性試験 …… １２
⑦交差反応性試験 …… １２
（2）実用的な性能試験 …… １３
①回収特性試験 …… １３
②測定精度試験 …… １３
５．データの品質管理 …… １４
６．データの管理、分析、表示 …… １４
７．監査 …… １４
８．評価 …… １４

資料

○　技術の先進性、その他

○　環境技術開発者提出資料（キットの概要等）

１．実証試験の概要と目的

１.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１６年８月３１日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）による簡易分析技術とする。

1.2 実証試験の視点

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

○　製品性能の信頼性

○　一般環境モニタリングでの実用性

○　製品操作等の簡便性

２．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表2.1　実証試験参加組織

実証機関	団体名	山口県環境保健研究センター
	住所	〒753-0871　山口市朝田５３５
	担当者所属・氏名	企画情報室　室長　古谷　長蔵
	電話番号	083-924-3670
	FAX 番号	083-924-3673
	E-mail アドレス	furutani.chozo@pref.yamaguchi.lg.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	京都市南区吉祥院車道町 48 番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部　開発・製造部　　伊東　茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

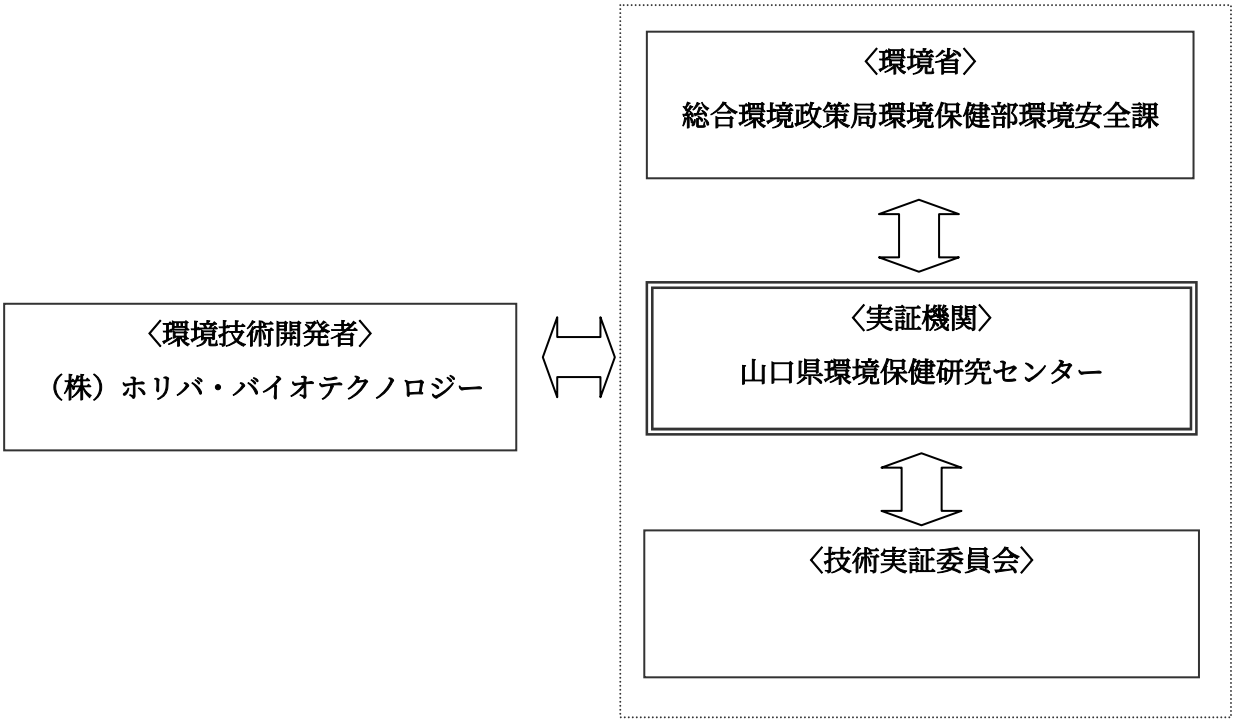


図 2.2　実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表2.3　実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	技術次長	五歩池　一二
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	生物学部長	松村　健道
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	専門研究員	數田　行雄
	実証試験における ELISA 法担当者	専門研究員	吹屋　貞子
	実証試験における ELISA 法担当者	研究員	村田　加奈子
	実証試験における機器分析の総括責任者	水質部長	手島　義人
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	主任	田中　克正
	実証試験における機器分析担当者	専門研究員	下濃　義弘
	実証試験における機器分析担当者	研究員	古谷　典子
	実証試験における機器分析担当者	研究員	澄田　和歌子
	実証試験における精度管理の総括責任者	企画情報室室長	古谷　長蔵
	実証試験における精度管理担当者	専門研究員	溝田　哲
	実証試験における精度管理担当者	大気部主任	杉山　邦義
	実証試験における精度管理担当者	理化学部専門研究員	立野　幸治
	実証試験品質管理責任者	企画情報室室長	古谷　長蔵
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	開発･製造部部長	伊東 茂壽
	実証対象製品の提供	開発･製造部副部長	門脇 篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発･製造部副部長	門脇 篤
	実証試験実施上の参考情報の提供	企画･営業推進部 部長	三宅 司郎

３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、イソプロチオランに対する特異的な抗体を応用した、環境水、農産物中のイソプロチオラン測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（イソプロチオラン濃度が高い試料では吸光度が低く、イソプロチオラン濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 3.2　実証対象製品のデータ（1）

項目	記　入　欄
製品名	イソプロチオラン測定キット
型番	EL102-00
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式、g）	350 g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	イソプロチオラン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（農産物）
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属（調整済／調整要）
操作環境（室温）	室温
製品保管条件	8℃以下
製品保証期間	製造後 10 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
測定時間	2～３時間

表 3.2　実証対象製品のデータ（2）

項目	記　入　欄
１．基本的な性能	
①測定範囲	6～100ppb
②検出下限及び定量下限	
③繰返し再現性	標準偏差：0.82～4.64　　変動係数：6.8～10.1%
④日間再現性	標準偏差：1.34～4.80　　変動係数：10.4～12.6%
⑤期間再現性	保存安定性
⑥プレート間再現性	
⑦交差反応性	交差率：＜0.1%（測定した対象農薬すべて）
⑧その他	
２．実用的な性能	
①回収特性	回収率：102.1～116.7%
②測定精度等	
③その他	
試験責任者	伊東　茂壽
試験年月日	平成　年　月　日

４．実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 1 月下旬～平成 17 年 2 月下旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1　実証試験のスケジュール（予定）

	11 月	12 月	1 月		2 月		3 月	
	29 日	2 週	2 週	5 週	1 週	4 週	2 週	4 週
実証試験計画の策定								
対象技術の選定、計画書案作成	○							
実証試験計画書策定、承認		○						
実証試験の実施								
測定範囲の検討				○				
検出限界及び定量限界の検討				○				
繰返し再現性の検討				○				
日間再現性の検討				○				
期間再現性の検討				○		○		
プレート間再現性の検討				○				
交差反応性の検討					○			
回収特性の検討					○			
測定精度の検討					○			
監査の実施				○	○	○		
実証試験結果取りまとめ					○	○		
技術実証委員会の実施	○		○				○	
報告書の作成								○

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
１．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
２．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

（1）実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）に記入し、以下の事項を確認する。

〇管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

〇ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

〇ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

（2）ELISA キットの管理

〇ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

〇ELISA キットの分割を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分割の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表（様式 4.3）

受領年月日　　時　　分

番号（管理番号）　　－

メーカー名

品名

Lot. No.

搬入時確認事項

☐ 包装等に破損がない　　保管場所

☐ 保管温度（　　℃）　　保管温度

☐ 搬入時の温度管理

☐ 使用期限

☐ その他異常なし

担当者

（移動・分割等の記録）

番号（管理番号）　　－

メーカー名

品名

Lot. No.

搬入時確認事項

☐ 包装等に破損がない　　保管場所

☐ 保管温度（　　℃）　　保管温度

☐ 搬入時の温度管理

☐ 使用期限

☐ その他異常なし

担当者

（移動・分割等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル　ELISA法（イソプロチオラン）」の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質を用い、キットが指定する希釈濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダーモデル680XR）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク（BLK：添付の希釈液等）及び標準溶液指定濃度系列の吸光度（３重測定の平均値）から、４-parameter logistic fitting 後、検量線を作成する。（検量線作成用の解析ソフト：バイオ・ラッド社製マイクロプレートマネージャー5/PC）

オ．実測濃度の算出

前項で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

（1）基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

○試験用試料溶液の調製

イソプロチオランの市販標準物質（和光純薬工業）を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1　標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度
標準溶液指定濃度系列	イソプロチオラン	0，6，15，40，100 μg/L
①測定範囲 ④日間再現性 ⑤期間再現性 ⑥プレート間再現性	イソプロチオラン	0，6，15，40，100 μg/L
②検出下限及び定量下限	イソプロチオラン	6 μg/L
③繰返し再現性	イソプロチオラン	20 μg/L
⑦交差反応性	ダイアジノン イプロベンホス	0，1.2，3，8，20 mg/L 0，1.2，3，8，20 mg/L

①　測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、各調製濃度と実測濃度との比較、変動係数から指定された測定範囲の妥当性について検討する。

②　検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。

③　繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、得られた 8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数（n=8）から、繰返し再現性について検討する。

④　日間再現性試験

同一測定者が 1 週間の異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討する。

⑤　期間再現性試験

同ロット（製造年月日が同じ）の 2 枚のプレートを用いて、1 ヶ月以上離れた時期に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、プレート間の比較から期間再現性について検討する。

⑥　プレート間再現性試験

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討する。

⑦　交差反応性試験

イソプロチオラン及び類似物質（ダイアジノン、イプロベンホス）について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求める）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求める。（イソプロチオランの 50%阻害濃度/類似物質の 50%阻害濃度）×100（%）で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、調製した試料溶液のみでは 50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20 または 10%阻害濃度で代用する。

（2）実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

① 回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（イソプロチオラン）を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、３重測定した実測濃度から平均値、回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：イソプロチオラン	20μg/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	0，1，5，10，50 mg/L

② 測定精度試験

3 地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過を行って測定する。

同一河川水について、所定のマニュアル（前処理法を含む）に従って機器分析を行い、ELISA 法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性（測定時間、操作数）について、環境試料への適用性の観点から検討する。

５．データの品質管理

実証試験は、「品質管理マニュアル」に従って行い、作成した文書及び記録については、適切に保管・管理する。

６．データの管理、分析、表示

（１）データの管理

実証試験で得られたデータは、識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10 年間維持した後、廃棄するものとする。

（２）データの分析と表示

実証試験で得られたデータは、必要に応じて統計処理を行うとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

7. 監査

実証試験が適切に実施されていることを確認するために、実証試験の期間中に１回以上監査を実施する。

８．実証試験の評価

実証試験結果の評価は、3.2 実証対象製品のデータと本実証試験結果を比較し評価する。

なお、3.2 実証対象製品のデータがないものについては、ELISA 法による一般的な製品のデータを参照して評価する。

また、「実用的な性能試験」結果については、環境試料への適用性等の観点から評価する。

資料

１．技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。
特開２０００－８６６５４「イソプロチオランのハプテン化合物、抗体および測定方法」

２．その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。
本キットは農作物中の残留農薬測定用に開発したものであるが、イソプロチオランは「PRTR 法対象物質」にリストアップされており、環境水での適応を確認するため申請するものです。

研究用試薬

スマートアッセイ シリーズ（環境測定用）
イソプロチオラン測定キット

1. はじめに

本品は、イソプロチオラン(農薬商品名：フジワン，日本農薬株式会社製)と、その抗体との特異的反応を利用した酵素免疫測定法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay、ELISA）によるイソプロチオランの測定キットです。イソプロチオランの測定に必要な全ての試薬をパッケージしており、煩雑な試薬調製の必要がなく、測定したい時にすぐにお使いいただけます。

2. 測定原理

本キットは、環境水等中のイソプロチオランを ELISA で測定するものです。すなわち、イソプロチオランと特異的に反応する抗体を固相化したマイクロプレートに、抗原（標準試液または未知試料中のイソプロチオラン)と標識抗原（イソプロチオラン酵素標識物）とを同時に加えて反応させます（競合反応）。反応後、上清(遊離型標識抗原)を吸引除去し、プレートに結合した標識抗原(結合型標識抗原)の酵素活性を吸光光度法により計測します。その吸光度は結合型標識抗原量を反映し，標準試液または未知試料中のイソプロチオラン量に反比例します。標準試液のイソプロチオラン濃度に対し、その吸光度をプロットして作成した検量線から未知試料中のイソプロチオラン濃度を求めます。

3. 測定キットの特徴

1)高感度－イソプロチオランを6～100 ppb の範囲で測定できます。
2)簡　便－機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
3)迅　速－前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
4)低コスト－高価な機器を必要とせず、測定場所を特に選ばないため、コストを安くできます。

4. 測定キットの構成

1キットに含まれる試薬の内訳は、第1表の通りです。
1キットで 96 回の測定ができます。

第１表　キットの構成

	品名	容量	剤型	数量
①	イソプロチオラン抗体プレート	8ウエル×12 列 （96 ウエル）	乾燥品	1 枚
②	イソプロチオラン標準試薬 （100 ppm）	1.5 mL	液状品	4バイアル
③	イソプロチオラン酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
④	洗浄試薬(10 倍濃縮)	50 mL	液状品	1 バイアル
⑤	発色試薬	13 mL	液状品	1 バイアル
⑥	発色停止試薬	13 mL	液状品	1 バイアル
⑦	プレートシール			1 枚

5. 測定に必要な試薬・器具・装置

（1）試薬
①イソプロチオラン測定キット：ホリバ・バイオテクノロジー社製
②精製水
③メタノール：環境分析用
④10%メタノール：精製水を用いて 10 倍希釈

（2）器具
①マイクロピペット（50～200 μL,1000 μL）および専用チップ
②メスシリンダー：500 mL
③試験管：ガラス製、10 mL
④ホールピペット：ガラス製
⑤メスフラスコ：ガラス製
⑥ガラス繊維フィルター（ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55 または同等品）

（3）装置
①ストップウォッチ：秒単位まで表示
②試験管ミキサー
③マイクロプレートリーダー：スマートリーダー（ホリバ・バイオテクノロジー社製）
④マイクロプレート洗浄機：スマートウォッシャー(ホリバ・バイオテクノロジー社製)

6. 試液の調製

1）試液調製上の留意事項
（1）試薬は、使用 30 分前に冷蔵庫から出し、室温に戻してから使用して下さい。
（2）試液調製時のピペット操作は、可能な限り正確に行って下さい。
（3）製造番号の異なるキットの構成試薬を組み合わせて使用しないで下さい。
（4）イソプロチオラン標準試液は必ず使用時に調製して下さい。
（5）イソプロチオラン標準試薬原液の溶媒であるメタノールが揮発しますので、分取後は速やかにキャップを締めて下さい。

2）試液の調製

①イソプロチオラン抗体プレート
そのまま用います。

②イソプロチオラン標準試液
ステップ-1 からステップ-3 の手順で調製します。正確を期すために、調製にはメスフラスコおよびホールピペットの使用をお勧めします。

a）ステップ-1
イソプロチオラン標準試薬（100 ppm）をメタノールで100倍希釈し、100倍希釈液（1 ppm）を調製します。

b）ステップ-2
100倍希釈液（1 ppm）を精製水で10倍希釈し、10倍希釈液（100 ppb;10%メタノール溶液）を調製します。

c）ステップ-3
10倍希釈液（100 ppb;10%メタノール溶液）と10%メタノールを用いて下記濃度のイソプロチオラン標準試液を調製します。参考として20 mLメスフラスコとホールピペットを用いた場合を記載しています。

標準試液濃度（ppb）	100	40	15	6	0
10倍希釈液（mL）	*	8	3	1.2	*
10%メタノール（mL）	*	12	17	18.8	*

③イソプロチオラン酵素標識物試液
酵素標識物試薬に精製水6 mLを加えて溶解し、イソプロチオラン酵素標識物試液とします。

④洗浄試液
洗浄試薬に、精製水450 mLをメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄試液とします。

⑤発色試薬
そのまま用います。

⑥発色停止試薬
そのまま用います。

7. 測定操作

1）測定操作上の留意事項

①分注液が、ウェルの壁面に付かないように分注して下さい。

②マイクロプレートは、8 ウェルずつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数だけ使用することができます。未使用部分は、乾燥剤とともにチャック付きラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存しておけば、次回も使用することができます。

③反応中は、マイクロプレートを静置して下さい。

④分注する際は、泡が入らないように注意して下さい。

⑤正確な分析を行うため、それぞれの反応時間は正確に行って下さい。

⑥プレート裏面には触れないように注意して下さい。

⑦測定は、少なくとも2重測定（Duplicate）で行って下さい。

2）測定方法

ろ 過
↓
試料をガラス繊維フィルター等を用いてろ過し、メタノール10%溶液に調製します。

混合液の調製
↓
イソプロチオラン標準試液または試料150 μLをマイクロピペット(50～200 μL 用)で試験管に取り、それぞれにイソプロチオラン酵素標識物試液150 μLをマイクロピペット(50～200 μL 用)で加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

競合反応
↓
抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液100 μLずつをマイクロピペット(50～200 μL用)で分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温(15～25℃)で1時間反応させます。
※専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて測定を行う場合は、標準混合液の配置が決まっていますので、リーダーの取扱説明書に従って使用して下さい。

プレートの洗浄
↓
反応液を吸引除去し、洗浄試液300 μLで3回洗浄します。
※ウェルの底に洗浄試液が残っていないことを確認して下さい。
※測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

発色反応、発色反応停止
↓
マイクロピペット(50～200 μL用)で発色試薬100 μLを加えて室温(15～25℃)で 10 分間反応させた後、発色停止試薬100 μLをマイクロピペット(50～200 μL用)で添加して下さい。
※各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。
※発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。

吸光度測定
波長450 nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
イソプロチオラン標準試液の濃度に対し吸光度をプロットし、検量線を作成します。
※“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的になされ、表示されます。
※吸光度測定は発色反応停止後15分以内に行って下さい。

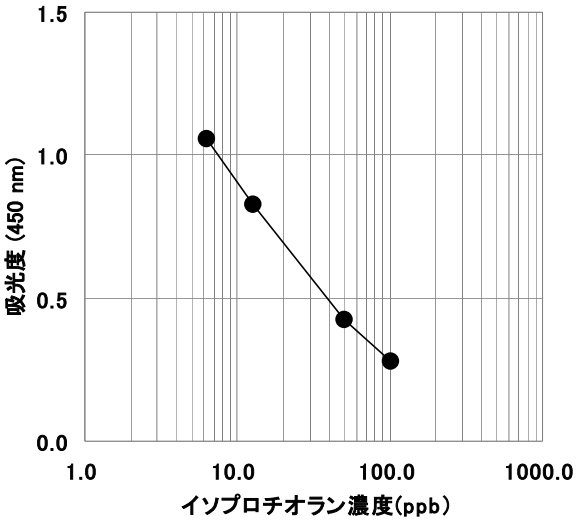
3）試料中のイソプロチオラン濃度の計算

イソプロチオラン標準試液による吸光度の平均値を求め、片対数方眼紙の横軸にイソプロチオラン濃度（X）を、縦軸にそれに対応する吸光度（Y）をプロットして検量線を作成します。この検量線に試料の吸光度の平均値をあてはめ、試料中のイソプロチオラン濃度(単位は ppb)を求めます。ただし、Xは対数です。一例を第1図に示します。

※検量線は、測定実験ごとに作成して下さい。

※試料の測定は、検量線範囲内の濃度（6 ～100 ppb）で行って下さい。100 ppbを超える高濃度の試料の場合は、精製水で希釈した後、再測定してください。また、6 ppb以下の試料を測定される場合は、固相抽出による濃縮を行って下さい。

※単位 ppb は part per billion の略で、10億分の1を表します。



第１図 検量線例

８． 測定キットの反応特性

本キットに用いている抗体の各種農薬に対する交差反応性は、第2表の通りです。

第 2表 類縁化合物との交差反応性

農薬	商品例	交差反応性(%)
イソプロチオラン	フジワン	100
ダイアジノン	ダイアジノン、エキソジノン	＜0.1
プロパホス	カヤフォス	＜0.1
フェニトロチオン	スミチオン	＜0.1
ブプロフェジン	アプロード	＜0.1
ベンフラカルブ	オンコル	＜0.1
フィプロニル	プリンス	＜0.1
エトフェンプロックス	トレボン	＜0.1
フェノブカルブ	バッサ	＜0.1
フルトラニル	モンカット	＜0.1
フラメトピル	リンバー	＜0.1
プロベナゾール	オリゼメート	＜0.1
イプロベンホス	キタジンP	＜0.1
ピロキロン	コラトップ	＜0.1
チオファネートメチル	トップジンM	＜0.1

９． 貯法・有効期間

貯法 ：遮光して 2～8℃に保存します。
有効期間 ：製造日から 10 箇月です。

１０． 注意事項

①使用前に、取扱説明書等をよくお読みいただき、注意事項をお守り下さい。
②責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
③試薬類は冷蔵庫(2～8℃)で保存して下さい。
④イソプロチオランを含む廃液及び発色反応停止後の液(希硫酸を含む)は回収し、環境中に廃棄しないで下さい。
⑤吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。
⑥身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けて下さい。
⑦開封後は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管して下さい。
⑧保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守して下さい。
⑨食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。
⑩測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行って下さい。

株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
〒601－8315 京都市南区吉祥院車道町 48 番地
TEL.075－692－1786 FAX.075－692－1790
http://www.horiba-biotech.co.jp